

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Hans Vellama

**PepFect14 *in vivo* transfektsiooniefektiivsuse hindamine hiire kopsus ja maksas
laserkonfokaalmikroskoobiga.**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja Kaido Kurrikoff, PhD

TARTU 2015

Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid.....	3
Sissejuhatus.....	5
Kirjanduse ülevaade.....	6
Transfektsioon.....	6
Transeksioonimeetodid	7
Geeniteraapia.....	9
DNA delivery	10
Rakku sisenevad peptiidid ehk RSP-d	11
Kargo sidumine RSP-ga	11
Rakkudesse sisenemine	12
RSP kasutamine nukleiinhapete transpordiks rakku	13
Transportaan.....	14
PepFect14.....	15
Pegüleeritud PF14	15
Reporter mehhanismid	16
Reporterplasmiid mCherry	17
Eksperimentaalne osa.....	19
Töö eesmärgid.....	19
Materjalid ja meetodid	19
Tulemused ja arutelu	22
Kokkuvõte.....	26
Kasutatud kirjandus.....	29
Kasutatud internetileheküljed.....	35
Lisa 1	36
Lisa 2.....	37

Kasutatud lühendid

CAT	<i>Chloramphenicol acetyltransferase</i> , kloramfenikool atsetüültransferaas
CR	<i>Charge ratio</i> , laengu suhe
DAPI	6-diamidino-2-fenüülindool
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , roheliselt fluorestseeruv valk
HA2	Hemaglutiniini 2
IHC	<i>Immunohistochemistry</i> , immunohistokeemia
LSCM	<i>Laser scanning confocal microscopy</i> , laser saknneeriv konfokaalmikroskoop
MQ	Deionoseeritud vesi
NGS	<i>Normal goat serum</i> , tavaline kitse seerum
NLS	<i>Nuclear localization signal</i> , tuuma lokalisatsiooni signaal
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , fosfaatpuhverdatud füsioloogiline lahus
pDNA	plasmiidne DNA
pEGFP	Võimendatud roheliselt fluorestseeruvat valku (<i>Enhanced green fluorescent protein</i>) kodeeriv plasmiidne DNA
PF14	PepFect 14
pmCherry	Plasmiid, mis ekspresseerib punaselt fluorestseeruvat valku mCherry
PMO	<i>Phosphorodiamidate Morpholino Oligo</i> , fosforodiamidaadiga morfoliino oligo
PNA	<i>Peptide nucleic acid</i> , peptiidnukleinhape
RLU	<i>Relative light unit</i> , suhteline valguse ühik
RNAi	RNA interferents
RSP	Rakku sisenev peptiid
SCARA	Klass A <i>Scavenger</i> retseptorid

siRNA	<i>Short interfering RNA</i> , lühike interfereeruv RNA
SKO	Splaissingut korrigeeriv oligonukleotiid
TP10	Transportaan10

Sissejuhatus

Geeniteraapia võimalikkuse avastamisest alates on otsitud meetodeid, kuidas transportida terapeutilisi nukleiinhappeid sihtmärkrakkudesse. Siiani on enamus kliinilisi katsetusi tehtud viraalsete vektoritega, mille valik on nende bioloogilist rolli arvestades vägagi loogiline. Ometi kaasnevad viraalsete vektoritega mitmed komplikatsioonid, mis panevad otsima teisi võimalusi. Nukleiinhapete transfekkeerimiseks rakkudesse on leitud erinevaid füüsikalisi ja keemilisi meetodeid. Geeniteraapia seisukohalt vaadates on keemilised meetodid eelistatumad, sest need pole nii invasiivsed, jõuavad kohtadesse kuhu füüsiliselt on keeruline ligi pääseda ja on lihtsamini manustatavad. Ometi on ka keemilistel meetoditel omad puudused nagu ebaspetsiifilisus, madal transfektsiooniefektiivsus ja toksilisus. Kahekümne aasta jooksul on arenenud ja arendatud uute vektoritena rakkudesse sisenevaid peptiide (RSP), mis on lühikesed, rakkudesse internaliseeruvad peptiidid, mis on võimelised endaga rakkudesse kandma erinevaid lastmolekule. RSP-d teeb ahvatlevaks nende kõrge efektiivsus, väga madal toksilisus ja võimalus juurde liita erinevaid markerjärjestusi, mis parandavad nende spetsiifilisust, endosomaalset vabanemist ja suunavad RSP kidlasse organelli. Kuigi RSP-d on efektiivsed pDNA transfektsioonivektorid rakukultuuris ja *in vitro* katsetes, siis *in vivo* mudelites, mis on olulised terapeutiliste rakenduste uurimiseks, on tulemused tagasihoidlikud ja vaid loetud edukad näited.

PF14 on rakkudesse sisenev peptiid, mis moodustab negatiivselt laetud nukleiinhapetega mittekovalentselt seotud komplekse ning mille puhul on demonstreeritud väga head transfektsiooniefektiivsust erinevates rakuliinides, kuid ka *in vivo* katsetes. Katsetes, kus hiirtesse süstiti intravenooselt PF14/pDNA komplekse suudeti pDNA edukalt transfekteerida erinevatesse kudedesse. Transfektsiooni efektiivsust mõõdeti pDNA-lt ekspresseeritava lutsiferaasi aktiivsuse järgi ning kõige kõrgemat geeniekspresiooni kirjeldati kopsus ja maksas. Käesolevas töös sooviti edasi selgitada, kuhu toimus transfektsioon kopsus ja maksa. Selleks kasutati fluorestseerivat valku ekspresseeriva plasmidi ja PF14 komplekse, mis manustati intravenooselt hiirtesse. Hiljem analüüsiti katseloomade kopsu ja maksa koelõike konfokaalmikroskoobiga, et näha, kas ja kuhu oli transfektsioon toimunud.

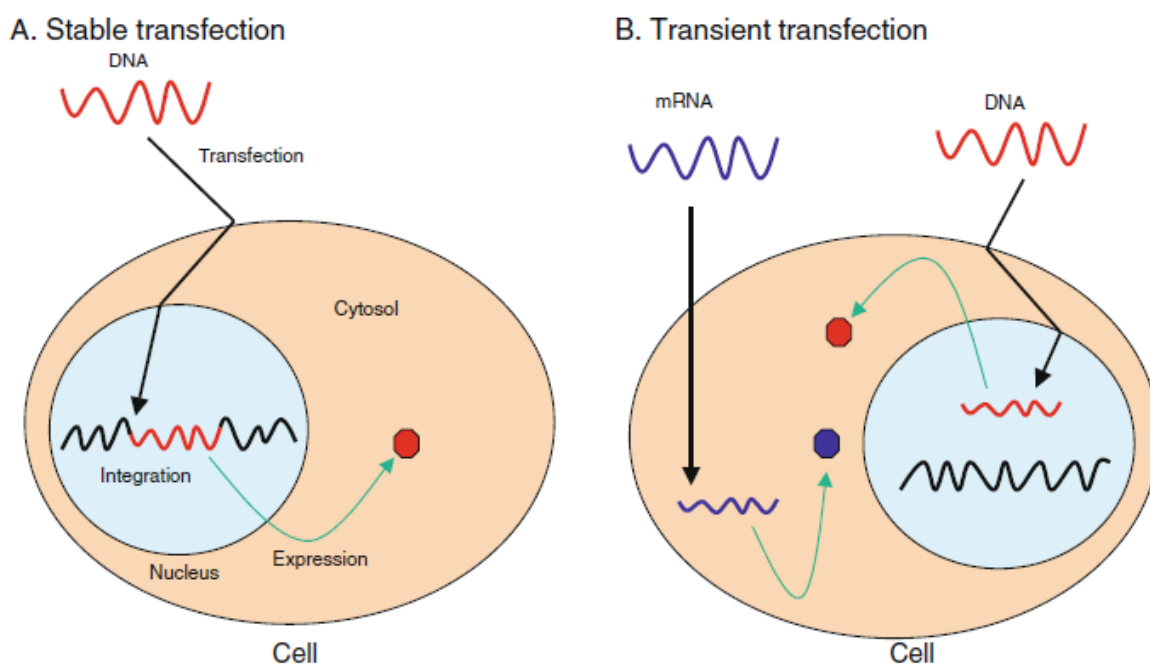
Töö on valminud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis.

Kirjanduse ülevaade

Transfektsioon

Transfekteerimine on nukleiinhapete tahtlik sisestamine eukarüootsesse või prokarüootsesse rakku. Transfekteerimine on oluline meetod ja vahend, mis võimaldab uurida rakufüsioloogiat ja manipuleerida sellega. Nukleiinhape, mis on negatiivselt laetud, peab lähenema ja läbima samuti negatiivselt laetud rakuembraani, ning tegema seda ilma rakku oluliselt vigastamata, mistõttu on see protsess tihtipeale väga komplitseeritud. Transfektsiooni teostamiseks on erinevaid meetodeid, mis võib tehniliselt jagada füüsikaliseks, keemiliseks ja bioloogiliseks. Kõik need meetodid ületavad rakumembraani poolt tekitatud barjääri erineval moel. (Kim ja Eberwine, 2010) Kuigi transfektsioon on *in vitro* katsete puhul vägagi edukas olnud siis *in vivo* katsetes on tulemused tavaliselt kehvemad ja pole *in vitro* katsete järgi ennustatavad (Ruponen *et al.*, 2003).

Transfektsiooni võib omakorda jagada funktsionaalselt kaheks, stabiilseks ja hajuvaks transfektsiooniks, mille skeemid on esitatud joonisel 1. Stabiilse transfektsiooni puhul on tegemist püsiva mehhanismiga, kus rakku sisestatud geenid integreeritakse raku genoomi. Sellise meetodi puhul ei kao selle geeni ekspressioon ka peale raku jagunemist ja tekitatakse transgeenne rakuliin. Hajuva transfektsiooni korral ei integreerita võõrast nukleiinhapet genoomi ja rakk ekspresseerib transfekteeritud geenilt vaid lühikest aega, kuni geen kaotatakse replikatsioonil või mõnel muul viisil (Recillas-Targa, 2006).



Joonis 1. Stabiilne (A) ja hajuv (B) transfektsioon (Kim ja Eberwine, 2010).

Bioloogiline, keemiline ja füüsikaline meetod toimivad väga erinevatel põhimõtetel, mida tuleb transfekterimisel arvestada. Parim meetod peaks olema kõrge efektiivsusega, rakule mittetoksiline, võimalikult vähe mõjutama raku füsioloogiat ning olema lihtne kasutada ja korrata (Kim ja Eberwine, 2010).

Transfektsioonimeetodid

Bioloogilised meetodid

Kliinilistes uuringutes kõige laialt levinud meetod on viiruse poolt vahendatud transfektsioon ehk transduktsioon. (Wirtha *et al.*, 2013). Viiruste omadus nakatada rakke võõr-DNA-ga teeb neist ideaalsed kandidaadid geeniteraapia jaoks. Kasutades ära viiruste nakatamismehhanisme, kuid vältides viiruse enda replikatsiooni ja toksilisust loodetakse luua viirusepõhiseid geenivektoreid. Viis peamist viiruste klassi, mida katsetatakse on onkoretroviiirused, lentiviirused, adenoviirused, AA-viirused (*adeno-associated viruses*) ja herpes simplex-1 viirused. Viraalseid vektoreid tuleb eristada üksteisest selle poolest, kas nad integreerivad oma genoomi raku genoomi (lentiviirused ja onkoretroviiirused) või paiknevad rakutuumas ekstrakromosoomsetena. Vastavalt ravi eesmärgist ja sellest, kas transduktsioon toimub jagunevate või mitte-jagunevate rakkudega tuleb valida ka sobiva funktsionaalsusega vektor. Viraalse geeniteraapiaga on näidatud edukaid katseid väga paljude erinevate haigusmodelite puhul (Thomas *et al.*, 2003), kuid suurem osa selles valdkonnas keskendub kasvajate ravimisele (Wirtha *et al.*, 2013).

Viiruse vahendatud transfektsiooni peamisteks miinusteks on tsütotoksilisus ja immuunvastuse põhjustamine. Viiruse sisestamine võib tekitada põletikulisi reaktsioone ja mutatsioone raku genoomis, sest viiruse DNA integreeritakse peremeesraku genoomi juhuslikult (Woods *et al.*, 2003). Lisaks on puuduseks viirusosakese piiratud mahutavus võõra nukleiinhappe pakkimisel. Eelnevalt kirjeldatud põhjustel pingutatakse, et leida ja täiustada mitteviiruslikke transfektsioonimehhanisme (Kim ja Eberwine, 2010).

Keemilised meetodid

Keemilised meetodid on tänapäeval uuringutes kõige enam kasutatavad ja nende meetoditega suudeti esimesena sisestada võõraid gene imetaja rakkudesse. Keemiliste meetodite puhul kasutatakse tavaliselt erinevaid ühendeid, mis moodustavad nukleiinhapetega komplekse nagu näiteks katioonsed polümeerid, kaltsiumfosfaat, katioonsed lipiidid ja katioonseid aminohapped. Kõigi keemiliste meetodite põhimõte on enamasti sama: positiivselt laetud molekulid või polümeerid moodustavad negatiivselt laetud nukleiinhappega komplekse ning need positiivselt laetud kompleksid omakorda tõmbuvad negatiivselt laetud membraani poole. See kuidas täpselt erinevad kompleksid läbi rakumembraani sisenevad ei ole teada, ning sõltub DNA vektorist, kuid üldjuhul arvatakse, et see on seotud endotsütoosi ja

fagotsütoosiga. Lisaks rakumembraani läbimisele peab DNA ja transfektsioonireagendi kompleks liikuma tsütosoolist rakutuumas, et toimuks DNA transkriptsioon. Jällegi pole konkreetne mehhanism teada, kuidas DNA tuuma viiakse (Kim ja Eberwine, 2010). Katsetatud on ka erinevaid meetodeid NLS järjestuse lisamisega, et parandada DNA transpordi tuuma (Won *et al.*, 2011).

Keemiliste meetodite transfektsiooniefektiivsus sõltub paljuski näitajatest nagu kemikaali ja DNA vahekord, lahuse pH ja rakumembraani seisund. Tundlikkus kõigile nendele tingimustele tingib selle, et keemiline meetod on ebaühtlasemate tulemustega ja madalama efektiivsusega kui viiruse poolt vahendatud transfektsioon. Eriti madal on efektiivsus *in vivo* katsetes ja sõltub ka transfekteeeritavast rakutüübist. Teisest küljest on positiivseteks omadusteks suhteliselt madal tsütotoksilisus, ei esine mutageneesi, pole mittevajalikku DNA-d ja pole piiranguid pakitava nukleiinhappe suurusele (Kim ja Eberwine, 2010).

Lipofektsioon on üks efektiivsemaid ja enam kasutatavamaid mitteviraalseid transfektsioonimeetodeid. Lipofektsiooni puhul moodustavad positiivselt laetud katioonsed liposoomid negatiivselt laetud DNA-ga komplekse, mis transporditakse rakumembraaniga ühinedes rakkudesse. (Ivanova *et al.*, 2013). Kaubanduslikult kättesaadav *Lipofectamine*® 2000 on hektel üks enim kasutatud ja tsiteeritud transfektsioonireagente, mida kasutatakse väga erinevate rakkude transfekteeerimisel nii RNA kui DNA-ga.¹

Füüsikalised meetodid

Füüsikalised transfektsioonimeetodid on kõige hiljutisemad ja nende puhul kasutatakse nukleiinhappe sisestamiseks rakku erinevaid tööriistu. Meetodite hulka kuuluvad otsene mikroinjektsioon, biolistiline meetod, elektroporatsioon ja laseril põhinev transfektsioon. (Mehier-Humbert ja Guy, 2005)

Mikroinjektsiooni puhul süstitakse nukleiinhape otse raku tsütoplasmasse või rakutuumas. Õnnestunud katse korral saadakse küll nukleiinhape rakku, kuid transfekteeeritud plasmidi kontsentratsiooni ja transfektsiooniefektiivsuse määramine pole üheselt määratletavad. Samuti on selle meetodi puhul miinuseks transfekteeeritavate rakkude piiratud valik ja töömahukas keeruline protseduur. (Recillas-Targa, 2006).

Biolistilise meetodi puhul kasutatakse mikrokandjaid (enamasti kullaosakesed), mis on konjugeeritud nukleiinhapetega ja tulistatakse siis rakkudesse suurel kiirusel. Meetod arendati välja vajadusest transformeerida taimerakke, kuid seda on võimalik rakendada ka loomsetele rakkudele. Meetod on küll efektiivne ja lihtne, aga vajab kallist varustust ja vigastab rakke. (O'Brien ja Lummis, 2006).

Füüsikalistest meetoditest enim kasutatav on elektroporatsioon. Rakud

suspendeeritakse elektrit juhtivas lahuses, mis sisaldab ka transfekeeritavat DNA-d, ning suspensioonist lastakse seejärel läbi mõni millisekund kestev elektriline impulss. Impulss permeabiliseerib rakumembraani põhjustades ajutiste pooride teket, kust kaudu saavad DNA molekulid rakku liikuda. (Shigekawa ja Dower, 1988). Elektroporatsiooni efektiivsus sõltub mitmetest tingimustest, kuid optimaalsete tingimuste leidmisel on võimalik saavutada kiire ja efektiivne transfektsioon paljudes rakkudes lühikese ajaga.²

Laseri kaudu vahendatud transfektsioonil (ehk optoporatsioon või fototransfektsioon) kasutatakse laserit, et tekitada membraani sisse ajutisi poore. Läbi laseri poolt tekitatud pooride liiguvad nukleiinhapped ekstratsellulaarse lahuse ja tsütosooli vahel oleva osmootse erinevuse tõttu rakku. Eeliseks teiste transfektsioonimeetodite ees on universaalsus, kirjeldatud meetod võimaldab jälgida transfekeeritavat rakku ja teha poore täpselt sinna kuhu soovitakse, aga vajalik lasermikroskoopia tehnoloogia on väga kallis. (Yao *et al.*, 2008)

Geeniteraapia

Geeniteraapia on meetodite kogum mõjutamiseks või korrigeerimaks mittefunktsionaalsete või vigaste geenide ekspressiooni. Kõikide geeniteraapia meetodite puhul toimub spetsiifilise nukleiinhappe transport rakkudesse.³ Euroopa Meditsiiniagentuur (EMA) defineerib geeniteraapias kasutatavaid ravimaineid kui bioloogilisi ravimeid: mis sisaldavad rekombinantseid nukleiinhappeid, mis viiakse inimorganismi eesmärgiga reguleerida, parandada, asendada, lisada või kustutada geneetilisi järjestusi; mille ainete ennetav, raviv või diagnostiline toime on otseselt seotud nukleiinhappe järjestusega või selle järjestuse geeniekspressiooni produktiga (Wirtha *et al.*, 2013).

Terapeutiliste ainete eduka transpordi korral on geeniteraapial potentsiaali ravida geneetilisi haigusi, aeglustada kasvaja arenemist, võidelda viiruslike infektsioonidega ja peatada neurodegeneratiivseid haigusi. (Verma ja Somia, 1997)

Kuigi enamus keharakkudesse on terapeutilise DNA sisse viimine võimalik siis eduka ravi eesmärgil tuleb enamasti täpselt määrata sihtmärkrakud. Näiteks kasvaja puhul, kus eesmärgiks on haiged rakud hävitada on vektori spetsiifilisus ülimalt oluline, et mitte vigastada normaalseid rakke, kuid haiguste puhul nagu hemofiilia on vaja hüübimisproteiine veres, mis võivad tulla erinevatest rakkudest nagu lihasrakud, maksarakud, fibroblastid või isegi vererakud. Lisaks tuleb arvestada, kui paljudesse rakkudesse DNA peab jõudma, et saada soovitud tulemust. (Verma ja Somia, 1997)

Seni on enamus geeniteraapia meetodeid põhinenud viiruslikel kandjatel nukleiinhapete transportimiseks rakku ja ka esimesed kliinilised katsed tehti viiruslike kandjatega. Kasutatavad viirused on modifitseeritud, kaotades nende patogeensed omadused.

See meetod on väga loogiline lähenemine, sest viirused omavad spetsiifilisi mehhanisme nukleiinhapete rakku sisestamiseks. Kuid takistuseks on inimese immuunsüsteem, mis reageerib viiruspartiklitele ja võitleb nende vastu, raskendades nukleiinhapete transporti rakkudesse. Viiruste põhjustatud immuunreaktsioonid on tõsiseks ohuteguriks, mida ilmestab ka traagiline juhtum 1999 aastast, kus ravimi kliinilises katsefaasis suri noor patsient. (Thomas *et al.*, 2003)

Mitteviraalsed vektorid on kohased nende kasutamise lihtsuse, madala immuunreaktsiooni ja lihtsama hulktootmise poolest. Nüüdseks on mitteviraalsete vektoritega jõutud ka efektiivsusega lähedale viiruslikele vektoritele. (Li ja Huang, 2000)

DNA transfektsioon geeniteraapias

DNA-l põhinev geeniteraapia toimib põhimõttel, et rakkudesse viiakse geen, mille produktiks olev valk on terapeutilise toimega. Selleks, et toimuks vastava geeni ekspressioon peab DNA jõudma rakutuuma, kus toimub mRNA transkriptsioon, mis on vajaliku valgu translatsiooni aluseks. Transgeeni ekspressioonist sõltub transfekteeeritud DNA ravitoime kestvus, mis oleneb sellest, kas kasutatud on integreerivat, mitteintegreerivat või asendavat DNA kandjat. Sõltuvalt, millist DNA vektorit on kasutatud toimub geeniekspressioon vastavalt ajutiselt, pikajaliselt, või püsivalt. Lisaks sõltub DNA toime ka transgeenilt ekspresseeritud valgu stabiilsusest ja poolestusajast. (Gary *et al.*, 2007)

Geeni transpordiga rakkudesse võib terapeutilise efekti saavutada mitmel erineval viisil. Kõige otsekohesem lähenemine on pärilike haiguste puhul vigase geeni identifitseerimine ning selle asendamine *wild type* terve geeniga. Samas üha rohkem kasutatakse geeniteraapiat ka mittepärilike haiguste raviks nagu näitkes kasvaja. Geeniteraapiaga vähi ravimisel võib üheks lähenemiseks olla rakkudele otseselt toksilist valku kodeeriva geeni sisse viimine. Näiteks *TNF* geen kodeerib TNF valku, mis on kehas normaalselt toodetud osades valgetes vererakkudes loomuliku kaitsena väiksemate kasvajate vastu. Teiseks lähenemiseks võib olla rakkudes suitsiidi tekitamine viies neisse sellise ensüümi geen, mis muudab tervetele keharakkudele ohutu eelravimi toksiliseks vähivastaseks ravimiks. Näiteks võiks kasutada tümidiinkinaasi geeni, et gantsikloviir muundataks vähirakkudes trifosfaatseks ühendiks, mis DNA ahelasse liitmisel katkestab DNA sünteesi kuna ühendil puudub 3'OH rühm ja see viib omakorda rakusurma (Cerepro®, mis on sellel põhimõttel toimiv ravim on kliinilistes katsetustes (Wirth *et al.*, 2013)). Lisaks võib kaudsemalt lähenedes kasutada vähirakkudesse viimiseks geene, mille ekspresseerimisel muutuvad rakud keha immuunsüsteemile paremini äratuntavaks. Seeläbi kasutatakse ära keha enda immuunsüsteem vähiga võitlemiseks. (Clark ja Pazdernik, 2009)

Rakku sisenevad peptiidid ehk RSP-d

Rakku sisenevad peptiidid e. RSP-d kuuluvad membraan-aktiivsete peptiidide rühma ja on lühikese aminohappejärjestusega peptiidid, mis pakuvad oma membraani läbimisvõime tõttu palju võimalusi biomeditsiinis (Figueiredo *et al.*, 2014). RSP-d on enamasti kuni 30. aminohappe pikkused peptiidid, mis oma keemiliste omaduselt poolest on tavaliselt katioonsed või amfipaatset. RSP võib olla kovalentselt või mittekovalentselt seotud nukleiinhapetega, proteiinidega, peptiididega jt. biomolekulidega ning transportida neid molekulide läbi rakumembraani tsütoplasmasse või tuuma. Vastavalt sellele, kuidas RSP on saadud jaotatakse neid sünteetilisteks (näiteks oktaarginiin ja polülüsiin), kimäärseteks (transportaan), ja loodulikeks (Tat ja penetratiin). (Langel, 2010)

Nüüdseks juba rohkem kui 20 a. tagasi tehti esimene ettepanek, et osad proteiinid ja tõenäolisemalt transkriptsioonifaktorid võivad omada võimet liikuda rakust rakku. (Heitz *et al.*, 2009). Esimene vaatlus sellisest proteiinist tehti Alan Frankeli ja Carl Pabo poolt 1988 kui nad täheldasid, et HIV-1 Tat proteiin on võimeline siseneda rakkudesse ja translokeeruma tuuma (Frankel ja Pabo, 1988). 1994 avastati 16 aminohappest koosnev RSP penetratiin, mis oli saadud äädikakärbse *Antennapedia* geeni homeodomeenist, millele eelnes avastus, et geeni homeodomeen siseneb närvirakkudesse (Derossi *et al.*, 1994). 1997 loodi esimene nukleiinhapetega mittekovalentselt seotud RSP, MPG, millele järgnes ka peptiidide ja proteiinide mittekovalentselt transportiks mõeldud RSP, Pep-1 (Morris *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 2001). Aastal 2000 näitas Wender, et ka polüarginiin (Arg8) on rakkudesse sisenev (Wender *et al.*, 2000). Läbimurreteks RSP valdkonnas olid rakendusliku kontseptsiooni tõestused *in vivo* katsetel. Dowdy grupp näitas peptiidide ja proteiinide transporti rakkudesse *in vivo* katsetes ja Langeli grupp näitas sama Transportaani PNA-de rakkudesse viimisel (Schwarze *et al.*, 1999; Pooga *et al.*, 1998.). Hiljem on mitmete teiste RSP-dega näidatud samasugust võimet viia lastmolekul rakkudesse. (Farkhani *et al.*, 2014; Figueiredo *et al.*, 2014)

Kargo sidumine RSP-ga

RSP-d võivad bioloogiliselt aktiivse lastmolekuli rakku transportida olles temaga, kas kovalentselt seotud või moodustades stabiilse mittekovalentselt seotud kompleksi. Kovalentselt võidakse lastmolekul RSP külge konjugeerida kovalentselt või kloonides RSP-kargo järjestuse liitvalguna. Kovalentsel sidumisel tuleb samas tähele panna, et sideme tüüp ja keemia võivad mõjutada RSP ja lastmolekuli efektiivsust ja stabiilsust (Heitz *et al.*, 2009). On täheldatud, et nii laetud oligonukleotiidide ja siRNA kovalentsel sidumisel RSPga langeb

nende lastmolekulide bioloogiline aktiivsus (Juliano *et al.*, 2008). Sellisel juhul on soovituslik kasutada rakus pöörduvat kovalentset sidumist (Muratovska A. ja Eccles M. R. 2004) või mittekovalentset sidumistüüpi (Margus *et al.*, 2012). Mittekovalentsel sidumisel kasutatakse enamasti lühikesi amfipaatsed RSP-sid, millel on hüdrofiilne (polaarne) ja hüdrofoobne (mittepolaarne) domeen (Heitz *et al.*, 2009). RSP ja lastmolekuli kompleks tekib sel juhul elektrostaatiliste interaktsioonide tulemusel (Morris *et al.*, 2008). RSP amfipaatsus võib väljenduda peptiidi primaarstruktuuris, kus aminohappeline järjestus määrab polaarse ja mittepolaarse osa, või sekundaarstruktuuris, kus peptiidi konformatsioon põhjustab polaarse ja mittepolaarse domeeni tekke (Heitz *et al.*, 2009). Mittekovalentse kompleksi moodustamine töötati välja kondenseeritud DNA transpordiks rakku koos endosomaalset vabanemist soosiva peptiidiga (Margus *et al.*, 2012).

Rakkudesse sisenemine

RSP-de rakku sisenemise efektiivsust mõjutavad mitmed parameetrid nagu: RSP sekundaarstruktuur, RSP ja membraanikomponentide vastastikmõjud, lastmolekuli tüüp ja aktiivne kontsentratsioon, raku tüüp ja membraani koostis. Seetõttu pole ühest sisenemismehhanismi kõikidele RSP-dele, kuid arvatakse, et esimene kontakt toimub enamasti läbi elektrokeeriliste interaktsioonide katioonse RSP ja rakumembraani anioonsete proteogükaanide vahel. (Heitz *et al.*, 2009).

Peptiididel nagu Tat (Console *et al.*, 2003) ja polüarginiin (Nakase *et al.*, 2007) on kirjeldatud elektrostaatilisi interaktsioone rakuvälise maatriksiga ja sisenemist läbi energiasõltuva endotsütoosi. Kuigi katioonsete RSPde peamise sisenemismehhanismina on kirjeldatud makropinotsütoosi (Kaplan *et al.*, 2005) on RSPdel kirjeldatud ka klatriin- ja kaveoliin-vahendatud endotsütoosi (Richard *et al.*, 2005; Veiman 2013).

Mitte endotsütoosi teel translokeeruvate RSP-de puhul on näidatud rakku sisenemist energiast ja temperatuurist sõltumatu viisil, otsesel translokatsioonil läbi rakumembraani või põhjustades endotsütoosisarnast membraani kumerdumist (Maniti *et al.*, 2012).

Lisaks võivad enamus RSP-de puhul toimida erinevad sisenemismehhanismid samaaegselt (Heitz *et al.*, 2009). Endotsütoosi mehhanismid hõlmavad endas lisaks endotsütootilisele sisenemisele ka endosoomist vabanemist, mis on kriitilise tähtsusega RSP-de ja lastmolekulide efektiivsuse tagamisel (Farkhani *et al.*, 2014). Osa RSP-si pääsevad endosoomidest nende keemiliste endosoomi lõhkuvate omaduste tõttu või makropinotsütoosisivesiikulite kehva terviklikkuse/kvaliteedi tõttu (Heitz *et al.*, 2009).

Lisades RSP-le *homing peptide* järjestuse on võimalik rakkudesse sisenemise efektiivsust ja spetsiifilisust (mis on RSP-de üks puudusi) parandada. *Homing peptide* sihtmärgiks on spetsiifilised raku pinnal ekspresseeritavad retseptorid või markerid millele *homing peptide* seostub. (Svensen *et al.*, 2012; Pang *et al.*, 2014)

RSP kasutamine nukleiinhapete transpordiks rakku

Erinevate RSPdega on näidatud nii PMO, PNA, oligonukleotiidide, siRNA ja DNA efektiivset transfektsiooni. Algsetlt juba 1998. aastal näidati, et Transportaniga seotud galanini mRNA antisense PNA transportimist rakkudesse ja selle kaudu mõjutatud valu reaktsioone (Pooga *et al.*, 1998). Ka mittekovalentseid meetodeid on kasutatud PNA ja DNA keemiliselt modifitseeritud analoogide transpordimisel rakkudesse. Pep-3-HypNA-pPNA vahendatud geenivaigistamine oli efektiivne paljudes rakuliinides ja 15 korda kõrgem kui Lipofectamiiniga moodustatud kompleksidel (Morris *et al.*, 2007).

Samuti on näidatud geenivaigistamise efekti penetratini ja Transportaniga kovalentselt seotud siRNA puhul (Muratovska ja Eccles, 2004). ON-ide, siRNA-de ja DNA transfektsiooniks kasutatakse siiski üha rohkem mittekovalentset strateegiat komplekside moodustamiseks kuna nende moodustamine on lihtsam, väiksematest kogustest piisab sama bioloogilise reaktsiooni tekkeks ja molekulide bioloogiline aktiivsus ei ole inhibeeritud. Komplekside moodustumine toimub läbi elektrostaatiliste ja hüdfoobsete interaktsioonide positiivselt laetud RSP ja negatiivselt laetud nukleiinhappe vahel. *In vivo* olulistest näitajatest on näidatud, et moodustunud kompleksid takistavad nukleaasset degradatsiooni ja pikendavad nende veres viibimise poolväärtusaega (Margus *et al.*, 2012). MPG-ga mittekovalentselt seotud siRNA kompleksid on näidanud efektiivset transfektsiooni erinevatesse rakuliinidesse kui ka *in vivo* kasvaja kasvu aeglustumises RNAi kaudu (Morris *et al.*, 2008). SKO-ga mittekovalentselt seotud PF14 kompleksid translokeeruvad edukalt HeLa pLuc 705 rakkudesse, parandades lutsiferaasi geeniekspresiooni 130 korda. (Ezzat *et al.*, 2011).

Võrreldes teiste terapeutiliste nukleiinhapetega on DNA transfektsioon keerulisem, sest tegemist on tunduvalt suurema molekuliga ning toimimiseks peab molekul jõudma rakutuuma. RSP-d on potentsiaalsed kandidaadid efektiivseks mitteviraalseks geenitransfektsiooniks kuna võimaldavad konjugeerida erinevate omadustega järjestusi, lahendades senised mitteviraalsete vektorite puudused. Seni on näidatud mitmete RSP-dega nagu KALA-Antp, TAT-Mu jt. efektiivset geenitransfektsiooni erinevates rakuliinides (Rukkumani Rajagopalan *et al.*, 2007; Min *et al.*, 2010). Samas on paljude RSP-de puhul märgatav erinevus *in vitro* ja *in vivo* mudelite vahel tulenevalt süsteemide keerukuse astmest.

Seetõttu on märkimisväärsed geeniekspressiooni *in vivo* mudelites suudetud indutseerida väheste RSP-dega. Pikalt oli ainukeseks edukaks näiteks amfipaadne RSP ppTG1, mis indutseeris RSP/pDNA kompleksi intravenoosel manustamisel lutsiferaasi ekspresiooni kopsudes (Rittner *et al.*, 2002). Nüüdseks on näidatud *in vivo* efektiivsust ka teiste RSP-de puhul, näiteks R15/pDNA (β -galaktosidaasi geen) komplekside subkutaansel manustamisel või rPOA/pDNA (lutsiferaasi geen) kompleksi intratracheaalsel manustamisel. (Won *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2007). Täpsustades RSP/nukleiinhape komplekside toimemehhanisme ja takistusi on võimalik täiustada ja välja töötada efektiivsemaid transfektsioonireagente (Rajpal *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2007).

Mitteviraalsete transfektsioonivektorite peamiseks puuduseks võrreldes viraalsete vektoritega on nende madal transfektsiooniefektiivsus. Suureks takistuseks on lisaks rakkudesse sisenemisele vektori poolt kantud nukleiinhapete sattumine endosoomidesse või nende lagundamine nukleaaside poolt (Farkhani *et al.*, 2014). Endosoomidest vabanemiseks on kasutatud histidiinide lisamist, mis tekitavad „proton sponge“ efekti (Kichler *et al.*, 2003), stearüülrühma lisamist peptiidi N-terminaalsesse otsa (Khalil I. A. *et al.*, 2004; Lehto T. *et al.*, 2011), RSP sünteesimist liitpeptiidina endosomolüütilise molekuli HA2-ga (Farkhani *et al.*, 2014) ja valgusest indutseeritud vabanemist (Endoh ja Ohtsuki 2009). Geenitransfektsiooni toimumiseks peab DNA jõudma tuuma, ning et paradada tuumas lokaliseerumist on kasutatud NLS järjestusi, kõige tavalisemalt SV40 T antigeeni NLS (PKKKRKV) (Heitz *et al.*, 2009). RSP MPG puhul on näidatud, et transfektsiooni efektiivsust mõjutavad ka peptiid/lastmolekul kompleksi suurus, see kuidas kompleksid moodustatud on ning milline on nende molaarne kontsentratsioon (Farkhani *et al.*, 2014). Stabiilsete komplekside moodustumine on oluline eduka geenitransfektsiooni toimumiseks (Martin *et al.*, 2007)

Kuna erinevad RSPd ja erinevad RSP-lastmolekuli kompleksid pole oma toimemehhanismide ja funktsionaalsuse poolest üheselt kirjeldatavad, tuleb iga uue kompleksi ja RSP puhul teostada arvukalt uuringuid, et selgitada molekuli ja kompleksi funktsionaalsus. Seda võib teha kahel viisil: *in vivo* või *in vitro*, jälgides märgistatud RSP või lastmolekuli paiknemist otseste ja kaudsete meetoditega.

Transportaan

Transportaan on 27. aminohappe pikkune peptiid, mis on moodustatud neuropeptiid galaniini N-otsa 12.-st funktsionaalset aminohappest ja lüsiini kaudu sellega seotud mastoparaanist. Transportaan on kimäärset päritolu rakku sisenev peptiid, mille puhul on näidatud kiiret internalisatsiooni retseptorsõltumatu viisil (Pooga *et al.*, 1998).

Transportaanist sünteesiti 9 erinevat lühemat analoogi, et leida järjestus, mis on oluline rakku sisenemiseks. Kolme (TP7) või kuue (TP10) aminohappe deletsioon N-terminaalsest otsast ei mõjutanud peptiidi sisenemiseefektiivsust. Nendest kahest TP10 ei mõjuta GTP-aasset aktiivsust ja pole ära tuntav galaniini retseptorite poolt, tehes sellest potentsiaallika RSP, millel on oluliselt vähem mittesoovitud kõrvalmõjusi. (Soomets *et al.*, 2000)

RSPde puhul on näidatud, et stearüülrühma lisamine aitab parandada nii siRNA kui pDNA transfektsiooniefektiivsust moodustades stabiilsemaid mittekovalentseid nanokomplekse ja parandades endosomaalset vabanemist (Mäe *et al.*, 2009). N-terminaalse sterüülrühma lisamine parandas ka TP10 puhul märgatavalt oligonukleotiidi transfektsiooniefektiivsust (võrreldes mittemodifitseeritud TP10-ga) (Mäe *et al.*, 2009). Stearüül-TP10 indutseeris märgatava bioloogilise efekti ka seerumis, viidates ka võimalikele *in vivo* aplikatsioonidele. (Mäe *et al.*, 2009).

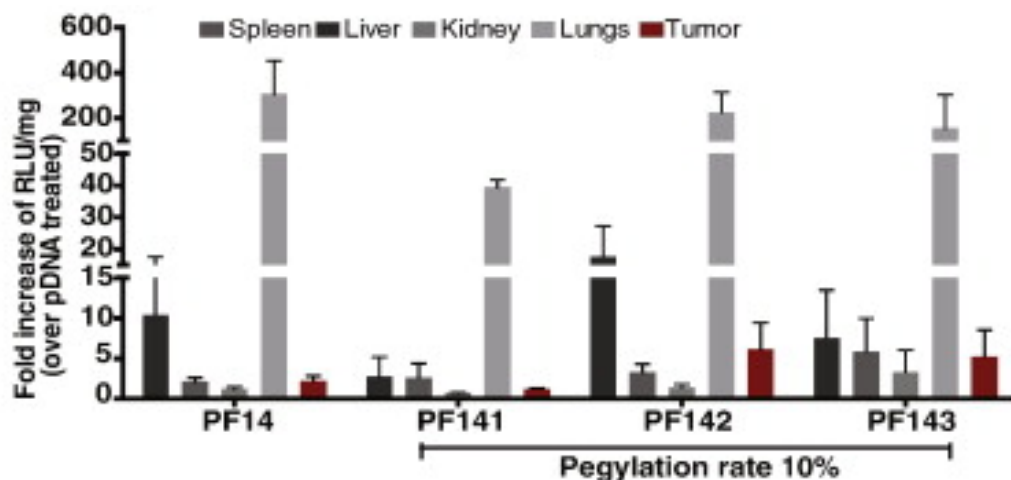
PepFect14

PF14 on sterüül-TP10 modifitseeritud versioon, kus lüsiinid ja isoleutsiinid on asendatud vastavalt ornitiinide ja leutsiinidega. PF14 on suuteline moodustama mittekovalentseid komplekse SKO-de, siRNA-dega ja pDNA-ga ning suudab neid efektiivselt erinevatesse rakuliinidesse transportida (Ezzat *et al.*, 2011; Ezzat *et al.*, 2012; Veiman, 2013). PF14/oligonukleotiid komplekside sisenemismehhanismina on kirjeldatud klass A *Scavenger* (membraansed glükoproteiinid) retseptorite (SCARA) poolt vahendatud kaveolaar vahendatud endotsütoosi. SCARA-de puhul on varem näidatu olulisust nukleiinhapete sisenemisel rakkudesse (Ezzat *et al.*, 2012). PF14 moodustab pDNAga negatiivse pinnalaenguga bioaktiivseid nanoosakesi, mis on suuteline läbi viima geenülekannet erinevates rakuliinides ja seda edukamalt kui eelasmolekul PF3 (Veiman *et al.*, 2013). PF14 nanoosakeste negatiivne üldlaeng võib anda eelise *in vivo* katsetes, lubades kauem kehas ringleda, tulenevalt sellest, et osakesed ei reageeri negatiivselt laetud seerumi kemikaalidega ja negatiivselt laetud membraanikomponentidega. Pikem viibimine vereringluses võib tagada spetsiifilisemat transfektsiooni kindlate retseptoritega kudedesse. (Veiman, 2013)

Pegüleeritud PF14

PEG molekuli lisamine on üldtunnustatud meetod transportvektorite stabiilsuse suurendamiseks vereringes (Perche ja Torchilin, 2013). PF14-PEG1000 molekulide puhul on PF14 külge kovalentselt konjugeeritud PEG molekul C-terminaalselt. Pegüleeritud peptiidiga

tehtud katsed näitasid, et ka PF14-PEG1000 on võimeline pDNA-d kondenseerima ja komplekse moodustama (ka CR2 juures kõige parem). Samuti oli PEG1000-PF14 mõju nanopartiklite transfektsioonile minimaalne, olles sarnane PF14-vahendatud partiklite geeniekspressioonile. Analüüsidest peptiidi mõju rakkude elumusele ei olnud PEG1000-PF14-l toksilist efekti. Võrreldes lutsiferaasi geeni transfektsiooni efektiivsust kommertsiaalse transfektsioonireagendiga Turbofekt jäi PF14-PEG1000 oma efektiivsusest alla, kuid näitas siiski kordades kõrgemat geeniekspressiooni kopsus ja maksas kui puhta pDNA puhul. (Veiman, 2015)



Joonis 2 Joonis 2. PF14, PF141(PEG600), PF142(PEG1000) ja PF143(PEG2000) transfektsiooniefektiivsus võrreldes (kordades üle) puhta pDNA-ga süstitud hiirtega. Võrreldud on transfekteeeritud lutsiferaasi geeni ekspresiooni, mõõtes valguse eraldumist lutsiferaasi reaktsioonil lutsiferiiniga (andmed on antud RLU/mg kujul) (Veiman *et al.*, 2015).

Reportermehhanismid

Geenitransfektsioonil peab eduka katse puhul jõudma DNA rakutuuma, kus toimub tema transkriptsioon ja saadakse mRNA, mis on valgusünteesi aluseks. Selleks, et uurida transfektsiooni efektiivsust kasutatakse erinevaid reportergeene, mis on transfekteeeritavates rakkudes aktiivse promootori all ja mille ekspresseerumisel saadakse kinnitus, et transfektsioon on õnnestunud. (Pham *et al.*, 2006)

In vivo katseteks reportergeenide valimisel ja kasutamisel tuleb hinnata ka erinevate kudede intratsellulaarset keskkonda ja kas promootor on konkreetse koe jaoks sobiv, sest vastasel juhul saadakse mittevõrreldavad tulemused kuna ekspresioon ei olene transfektsiooni efektiivsusest vaid rakuliinist. Lisaks tuleb arvestada ekspresiooniproducti sekretsiooniga ja võimaliku vabanemisega rakkude lüüsumisel. Efektiivsuse analüüsimisel ja mõõtmisel tuleks arvestada ka producti poolestusaega ja seda, et erinevates rakkudes lagundatakse seda erineva kiirusega. (McLean *et al.*, 1997)

Reportergeenideks on enamasti lihtsalt detekteeritavad ja mõõdetavad ühendid, mida tavaliselt transfekteeeritavates rakkudes ei ekspresseerita. Enamlevinud reportergeenid on CAT-geen (ensümaatiline detektsioon), β -galaktosidaasi geen (ensümaatiline detektsioon), Lutsiferaasi geen (luminesents), GFP-geen (fluoresents). (Recillas-Targa, 2006). Reportervalgu detekteerimine ja kvantifitseerimine annavad võimaluse hinnata transfektsiooni toimumist ja selle efektiivsust (transgeeni aktiivsust) (Pham *et al.*, 2006). Kui reportergeenina kasutatakse β -galaktosidaasi või CAT geeni toimub geeniekspressiooni tuvastamine ensümaatiliselt ja selleks tuleb loomad ohverdada ja eraldada organid, kus tahetakse geeniekspressiooni detekteerida. β -galaktosidaasi puhul määratakse geeniekspressioon X-gal-iga, CAT puhul homogeniseeritud koest eraldatud lahuses klooramfenikooli atsetüleerimise järgi. (Kim *et al.*, 2007; McLean *et al.*, 1997)

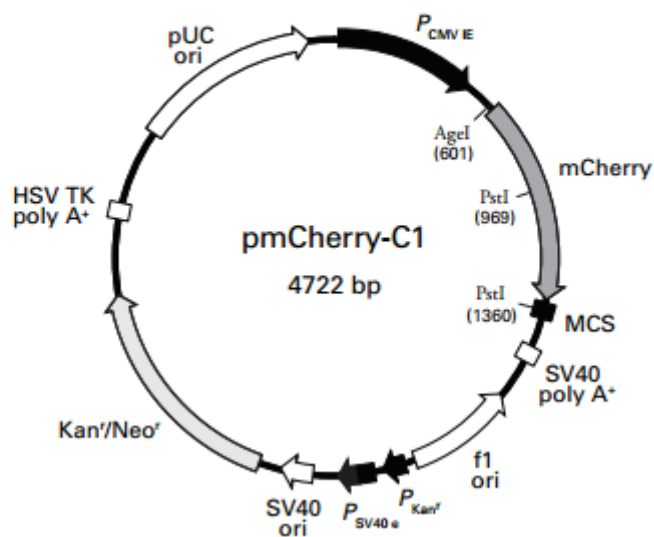
Nii lutsiferaasi kui ka GFP puhul on geeniekspressiooni tuvastamine võimalik nii eraldatud kudedes kui ka elusates loomades (Neua *et al.*, 2007; Rogers *et al.*, 2014; Choy *et al.*, 2003). Lutsiferaasi tasemed tuvastatakse lutsiferaasi reaktsioonis tema substraat lutsiferiiniga, mille käigus eraldub valgus. GFP detekteerimiseks tuleb molekuli ergastada välise valgusallika poolt õigel lainepikkusel. Tulenevalt valguse eritumise mehhanismide erinevusest on meetodid oma tundlikuse poolest erinevad. Kui GFP puhul on oluliseks faktoriks, mida peab arvesse võtma, võimalik autofluoresents, siis lutsiferaasi ja bioluminesentsi puhul on taustamüra väärtused oluliselt väiksemad. Lutsiferaasi puhul on tugevaks omaduseks tema tundlikus, mis võimaldab ka madalaid koguseid tuvastada, kuid samas ei ole võimalik, näiteks histoloogiliselt eristada, millistes rakkudes teda on ekspresseeritud. Erinevad on ka eritatava valguse lainepikkused (GFP-510nm; Luc-600), millest oleneb kui sügavalt koest on võimalik signaali tuvastada. GFP eeliseks on tugev signaal ja ruumiline resolutsioon, mis võimaldab teda kasutada kudedes transfektsiooni täpsemaks lokaliseerimiseks (transfekteeeritud kudede ja rakkude eristamine), mis lutsiferaasi puhul piirduv koe tasandiga. (Choy *et al.*, 2003). Näiteks on GFP-d kasutatud mitteviraalsel geenitransfektsioonil transfekteeeritavate rakkude spetsiifilisuse määramisel (Rogers *et al.*, 2014).

Reporterplasmiid mCherry

Antud töös on kasutatud reportervalguna ka mCherry't, mis on fluorestseeruv valk nagu ka GFP. mCherry arendati välja DsRed valgust, mis on korallides leiduv multimeerne, punaselt fluorestseeruv valk (Baird *et al.*, 2000). mCherry ergastusvalgus on 587nm ja emissioonivalgus 610nm. Mis teeb mCherryt sobiva reportervalgu on tema fotostabiilsus, monomeerne struktuur, pH resistentsus ja pikkalaineline emissioonivalgus. (Shaner *et al.*, 2004). Varajasemates uuringutes on mCherry tõestanud oma potentsiaali selgelt eristada

koeproovides rakud, mis mCherry valku ekspresseerivad (Saunders *et al.*, 2012). Joonisel 3 on nädatud mCherry geeni kandev pDNA vektor.

pmCherry-C1 Vector Information



Joonis 3: Fluorestseeruva valgu mCherry geeni kandev plasmiid. Joonisel antud vektorit kasutati ka käesolevas töös.⁷

Eksperimentaalne osa

Töö eesmärgid

- Transfekteerida mCherry-t ja EGFP-d ekspresseeriva plasmiidiga hiire kopsu ja maksa rakkusid.
- Hinnata transfektsiooni efektiivust ja transfektsiooni toimumise paiknemist kopsu ja maksa koes.

Materjalid ja meetodid

Kasutatud peptiid

Eksperimentides kasutatud peptiid sünteesiti molekularse biotehnoloogia labori poolt kasutades Fmoc tahke faasi peptiidisünteesi. PF14 ja PF14-PEG1000 peptiidide süntees toimus sama protokoll järgi nagu varem avaldatud artiklis (Veiman *et al.*, 2015).

Peptiid/pDNA partiklite moodustamine

Nanopartiklites kasutati pmCherry või pEGFP plasmidi. Peptiid/plasmiid mittekovalentsed partiklid moodustati MQ vees. Iga looma kohta võeti 20 µg pDNA-d, mis segati 1mM peptiidilahusega CR2 juures ja lahuse kogumaht hoiti 100 µl. Partiklid moodustati laengu suhtega 2, mille juures moodustuvad kõige stabiilsemad peptiid-pDNA kompleksid (Veiman, 2013). PF14-PEG1000 puhul segati kõigepealt MQ vees PF14-PEG1000 ja pDNA ning viis minutit hiljem lisati tavaline PF14. PF14-PEG1000/pDNA kompleksides oli PF14-PEG1000/PF14 suhe 1/5 (PEG1000 20%). 40 minutit peale komplekside moodustamist lisati neile 100 µl 10% glükoosilahust ja süstiti seejärel kohe hiirtesse.

In vivo katsed

Kõik hiirtega läbiviidud protseduurid ning eksperimendid on kinnitatud Eesti Eetikakomitee loaga (luba nr. 69 ja 70, 9 veebruar 2011) ning läbi viidud katseloomadega tööloaba omavate töötajate poolt. Kõik eraldatud koeproovidega tehtud töötused ja analüüsi viis läbi antud uurimuse koostaja.

Katsetes kasutati emaseid ning isaseid BalbC hiiri. Kõigi katsete puhul manustati kompleksid intravenoosselt sabaveeni kaudu. Kontrollkatse loomale süstiti puhta pDNA (20 µg) 5%-list glükoosilahust (200 µl). Hiired ohverdati ja koed koguti järgmisel päeval. pmCherryga transfekteeritud hiirte puhul süstiti 15 minutit enne nende ohverdamist intravenoosselt DyLight®488 lektiini lahust, mis tänu lektiini seostumisele membraansetele glükoproteiinidele aitab visualiseerida veresoone. Katse puhul, kus veresoonte märkimiseks kasutati IHC protokoll DyLight®488 lektiini ei kasutatud. Samuti ei tehtud seda pEGFP-ga

transfekteeritud loomade puhul, sest nii EGFP kui DyLight®488 emissioonivalguse vahemikud kattuvad.

Hüdrodünaamiline pDNA transfektsioon

pmCherry ja pEGFP transfektsiooni positiivse kontrollina tehti ühele hiirele HD pDNA manustamine. Hiirtele süstiti 10ug pmCherry-t lahustatuna 3 ml TransIT hüdrodünaamilise süsti lahuses (Mirus, USA) sabaveeni kaudu, millega indutseeriti pDNA ekspressioon maksas. Maksakude töödeldi histoloogiliseks uurimiseks samamoodi nagu kirjeldatud.

Kudede kogumine

Kudede eemaldamisel külmutati need koheselt kuival jääl olevas metüülbutaanis. Et paremini säilitada kopsukoe struktuuri mikroskoobist vaatlemiseks, tehti hilisemas katses pmCherry-ga transfekteeritud ja DyLight®488 lektiiniga süstitud loomadel lisaprotseduur kopsukoe eemaldamisel. Peale hiire ohverdamist süstiti läbi hiire trahhea kopsudesse 50% *Cryomatrixi* lahust PBS-is, kuni kopsud olid silma järgi hinnates täitunud. Seejärel külmutati kopsud nagu eelnevalt kirjeldatud. Külmunud koed hoiustati plastiktopsides -80 juures.

Külmpreparaadi valmistamine

Külmutatud kudedest lõigati krüotoomil 10-20 µm paksused lõigud. Krüotoomi kamber oli seatud -20°C, kude oli seadistatud temperatuurile -14...-16°C. Koelõigud asetati *Superfrost (Kindler)* alusklaasile ja hoiustati edasise töötlemiseni -80°C juures. Mikroskoobiga vaatlemiseks lasti lõikudel kuivada ja fikseeriti seejärel -20°C metanooliga 15min. Kui lõikudel ei tehtud iHC-d siis kinnitati katteklaas DAPI-t sisaldava *Vectashield®*-iga (*Vectashield HardSet with DAPI, Vector*) vastavalt tootejuhendile. Meetodit IHC korral vaata järgmisest ptk.-st. Valmis preparaadid hoiustati mikroskoopimise järel 4°C juures.

Rakutuumade ja veresoonte endoteeli visualiseerimine

Kõikide katsete puhul kasutati rakutuumade visualiseerimiseks DAPI-ga *Vectashield® Mounting medium*-it. Esimeste katsete puhul, kus transfekteeriti pEGFP-d ei toimunud veresoonte visualiseerimist. pmCherryga transfekteeritud loomade puhul kasutati esimese lähenemisena IHC protokolliga veresoonte endoteeli visualiseerimiseks. Kuna antud katsetes ei toimunud kopsu eemaldamisel kopsu täitmist siis saadi väga ebaselge ja ka madal signaal. Et saada selgemad tulemused kasutati viimastes katsetes (koos kopsu täitmisega eemaldamisel) veresoonte endoteeli visualiseerimiseks fluorentsismärgisega DyLight®488 lektiini.

IHC protokoll

Veresoonte endoteeli visualiseerimiseks kasutati IHC protokollis antiCD31 antikehasid. Antikehadega visualiseerimiseks pesti lõike metanoolis fikseerimise järgselt 3x5min PBS 0,25% TritonX-100 (PBST) lahusega (u. 2ml korraga). Peale pesemist blokeeriti 20 minutit PBST 5% NGS lahusega ja pesti seejärel uuesti PBST-ga. Seejärel lisati primaarne antikeha (rabbit anti mouse) antiCD31, mis oli lahustatud 1/300 2ml PBST 2%NGS ja jäeti üleöö seisma 4°C juures. Järgmisel päeval pesti koelõike kõigepealt 3x10min PBST lahusega ning seejärel lisati sekundaarne antikeha (goat-antirabbit Alexa488), mis oli lahustatud 1:1000 2ml PBST 2%NGS ja lasti tund aega seista toatemperatuuril ja valguse eest kaitstud. Lõpuks pesti koelõike veelkord 3x10min PBST lahusega ja lasti kuivada enne kui katteklaas kinnitati DAPI-t sisaldava Vectashield®-iga. Valmis preparaadid hoiustati mikroskoopimise järel 4°C juures. IHC protokolliga töödeldud koelõikude pilte vaata lisa 2.

Mikroskoopimine

Koelõikude vaatlemiseks kasutati Zeiss LSM710 konfokaalmikroskoopi. Koelõike vaadeldi 63X suurenduse juures õliimmersioonis. mCherry ergastamiseks kasutati laserit lainepikkusega 587nm (detektsioon 610nm juures). EGFP ergastati laseriga lainepikkusel 488nm (detektsioon 509nm juures) DAPI visualiseerimiseks valgustati kudet 358nm lainepikkuse juures (detektsioon 461nm juures). DyLight®488 lektiini ja antiCD31+Alexa488-sekundaarse antikeha visualiseerimiseks ergastati molekule laseriga 493nm juures (detekteeriti 518nm juures). Selleks, et emisoonivalguse lainepikkuse vahemikud ei kattuks ja signaalid oleks seostatavad konkreetse molekuliga detekteeriti signaale kahes kanalis (kuna DAPI ja Alexa488 emissioonivahemikud kattuvad), mCherry ja DAPI ühes ja Alexa488 teises kanalis. Saadud pilte töödeldi *ImageJ* pilditöötlusprogrammiga.

Tulemused ja arutelu

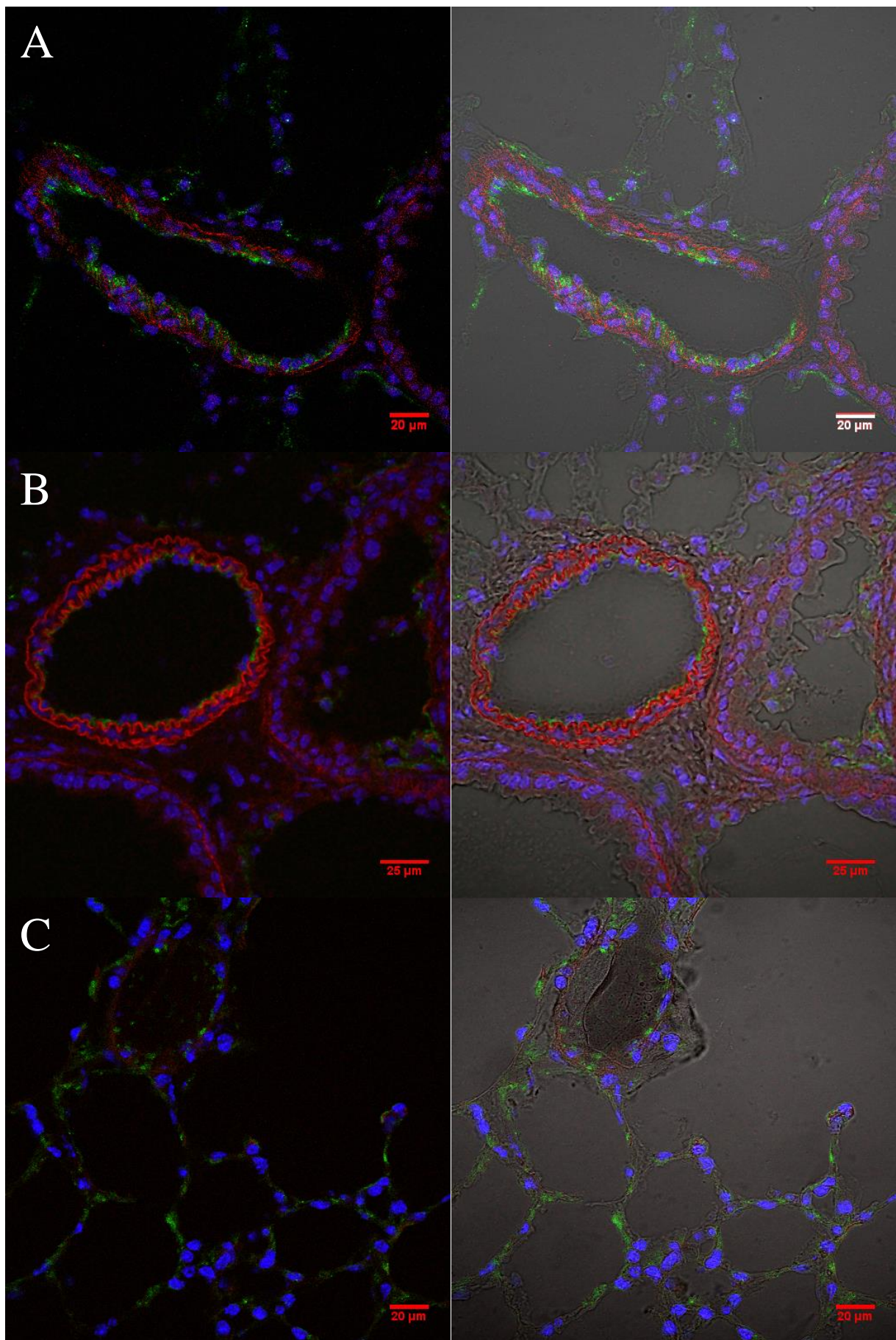
Tulemused on esitatud piltidena mis on võetud konfokaalmikroskoop Zeiss LSM710-iga ja töödeldud *ImageJ* pilditöötlusprogrammiga. Kopsu- ja maksalõikude analüüsiks kasutati internetist saadud materjale hiire histoloogia kohta.^{4, 5, 6}

Kopsu transfektsiooni tulemused

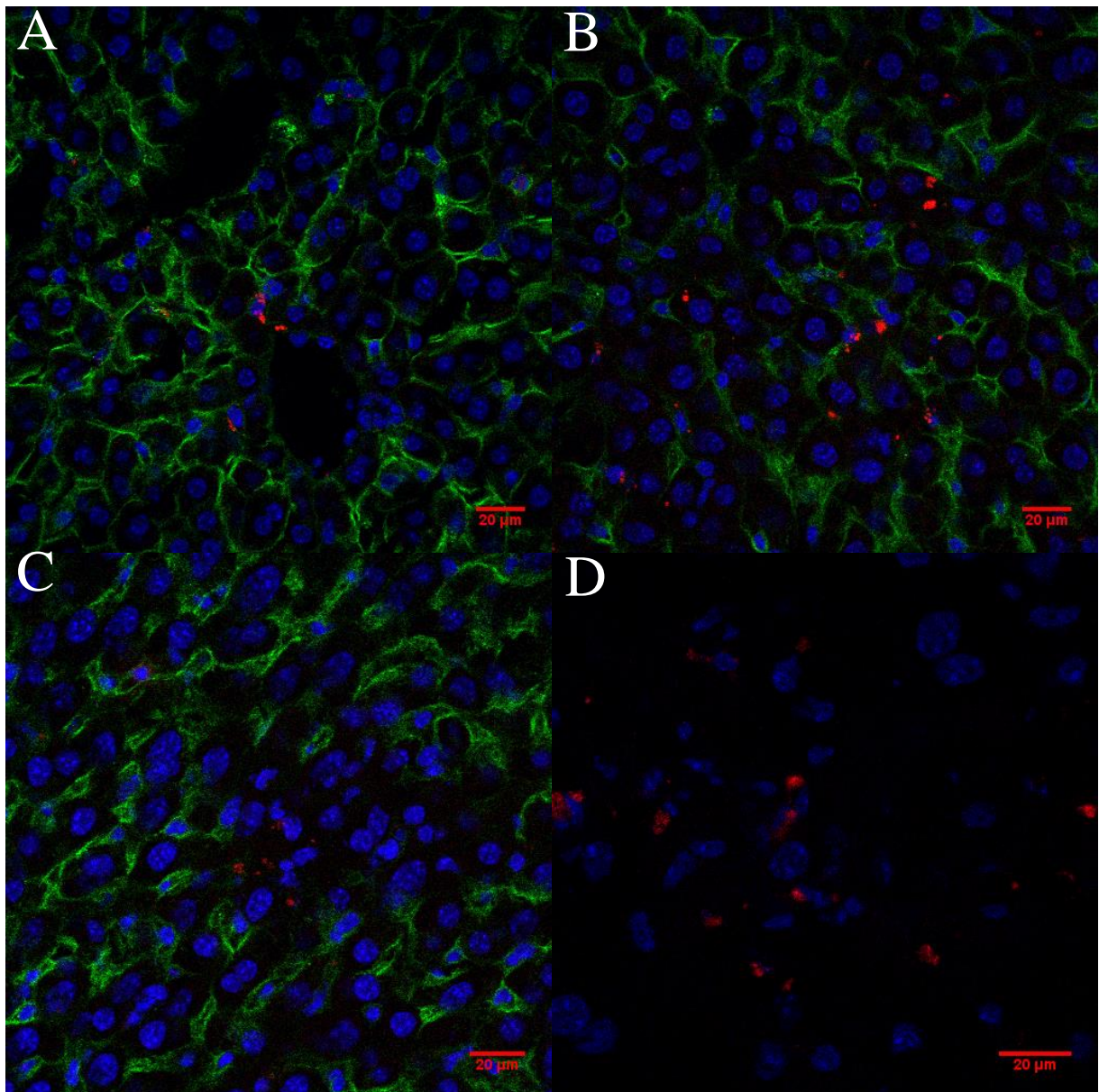
Vastavalt kas PF14/pDNA, PF14-PEG1000/pDNA või ainult pDNA-ga süstitud hiirte kopsudest tehtud koelõikude pildid on toodud joonisel 1. Võrreldes PF14 ja PF14-PEG1000-ga transfekteeritud hiirtega siis puhta pDNA-ga süstitud hiire kopsudes mCherry signaal puudub või on väga madal. Alveoolide rakkudes oli signaal üpris madal ka PF14/pDNA ja PF14-PEG1000/pDNA kompleksidega süstitud hiirtes. Alveoolide seintes oli siiski näha punast signaali voogavate joontena (vt. [lisa 2](#)), kuid sarnast punast signaali võis näha ka puhta pDNA-ga süstitud hiirte kopsudes (joonis 1;C). Selgem erisus paistab silma kopsude veresoontes ja bronhides, kus RSP-ga transfekteeritud loomades oli näha selgelt tugevamat signaali (fluoresentsi), mis moodustas selgeid mustreid. Võib täheldada, et sarnased mustrid ilmnesisid ka EGFP-ga tehtud katsetes (vt. lisa 1).

Tehtud katsetest saadud piltide põhjal on selge, et PF14 ja PF14-PEG1000 kantud transfektsioon toimus kopsudes edukalt, piirdudes selgemalt bronhidesse ja veresoontesse. Alveoolide transfektsiooni kohta on veel keeruline ühest vastust anda kuna signaal on nõrk ja sarnast signaali on võimalik näha ka kontrollkatsetena puhta pDNA-ga süstitud loomades. Et täpsemalt määrata millistesse rakkudesse ja millisel määral transfektsioon toimub tuleks histoloogilisele osale spetsiifilisemat tähelepanu pöörata, kasutades rakkuspetsiifilisi markereid (värvaineid), mis võib olla ka üks edasisi samme. Samuti on vajalik professionaalse histoloog-patoloogi hinnang.

Kopsude transfektsiooni on kirjeldatud ka paljude teiste keemiliste transfektsioonivektorite puhul ja seostatakse komplekside agregeerumisega ja sellest lähtuva nanopartikli toksilise toimega (Kangkang *et al.*, 2014). Seetõttu tuleks teha kindlaks, et ka PF14-ne puhul pole tegemist sarnase patoloogilise efektiga. Oluline on märkida, et üksikutel kordadel suri PF14/pDNA saanud hiir 30 minuti jooksul peale komplekside süstimist (sarnaselt teiste katioonsete nanopartiklite kasutamisel kirjeldatuga). Sellist toksilist toimet ei esinenud aga pegüleeritud PF14 puhul (Veiman *et al.*, 2015).



Joonis 4: Hiire kopsu lõigud. Ülevalt alla on paaris ilma pealtvalgustuseta ja valgustusega **A**: PF14/pmCherry-ga transfecteeritud hiir; **B**: PF14-PEG1000/pmCherry-ga transfecteeritud hiir; **C**: pmCherry-ga transfecteeritud hiired. Sinine signaal on DAPI-ga värvunud tuumad. Roheline märgib epiteeliga seostunud lektiinimolekule. Punane on fluorestseeruv mCherry valk.



Joonis 5. Hiire maksa lõigud. A: puhta pDNA-ga transfecteeritud maks(kontroll). B: PF14 transfecteeritud hiire maks. C PF14-PEG1000 transfecteeritud hiire maks. D: HD transfecteeritud pmCherry maks. Sinine signaal on DAPI-ga värvunud tuumad. Roheline märgib epiteeliga seostunud lektiinimolekule. Punane on fluorestseeruv mCherry valg..

Maksa transfectsiooni tulemused

Kompleksidega süstitud hiire maksa koelõikude pildid on toodud joonisel 2. Lisaks puhta pDNA-ga süstitud negatiivsele kontrollile tehti ka positiivne kontroll pDNA hüdrodünaamilise manustamisega, mis on tõestatud meetod transfectsiooni tekitamiseks maksas. Rohelise fluorestantsmärgisega lektiinimolekulid tekitavad maksa sinusoididesse seostudes roheliselt fluorestseeruva võrgustiku. Kõigi nelja erineva töötlusega looma puhul on võimalik selgelt eristada punast mCherry signaali, kusjuures kõige rohkem rakke on transfecteeritud PF14/pDNA-ga ja HD katsetes. Puhta pDNA-ga süstitud hiires tuli signaal veresoone (portaalveen või arter) ümber paiknevatest rakkudest ja väga üksikutest kohtadest

mujal. Võimalik, et PEG-i lisamisel on transfektsioon madalamaks jäänud, kuid see ei ole siiski päris ära kadunud. Varem on välja pakutud, et PEG-i lisamine vähendab mittesoovitud maksa transfektsiooni (Rogers ja Rush, 2012), mida küll varem pole täheldatud lutsiferaasi ekspresseeriva plasmiidi ja PEG-PF14-ga transfekterides (Veiman 2015).

Maksa puhul on huvitav, et kõikide katsete puhul (isegi puhta plasmiidi manustamisel) võis leida mCherry punast signaali. Teiseks on teada, et maks on samuti organ, mida mitmete keemiliste transfektsioonivektoritega suudetakse tihti transfekterida ja mida seostatakse maksa immunoloogilise rolliga organismis (Kangkang *et al.*, 2014).

Kokkuvõte

Mitteviraalsete geenitransfektsiooni meetodite avastamine ja välja töötamine on üha rohkem saamas tähelepanu kuna on lähenemas oma efektiivsuselt viraalsele transduktsioonile. Rakkudesse sisenevad peptiidid on üheks näiteks sellest valdkonnast ja viimase kahekümne aastaga on toimunud tormiline areng nende funktsionaalsuse ja efektiivsuse parandamisega. Algselt galaniinist ja mastoparaanist sünteesitud RSP transportaan on läbi ratsionaalse arenduse ning disaini modifitseeritud ja parandatud efektiivseks RSP-ks PF14. Välja töötatud PF14 on nukleiinhapetega mittekovalentselt komplekse moodustav ja neid rakkudesse transportiv RSP, mis on tõestanud oma potentsiaali ka *in vivo* katsetes. Käesoleva tööga sooviti tuua selgust PF14.-ne juba varem tõestatud kopsu ja maksa transfektsioonile.

Luc reportergeeniga tehtud katsete kogu organi geeniekspressiooni kvantitatiivne analüüs ei anna informatsiooni selle kohta millised rakud, kus kohas on transfekteeeritud. Selleks kasutati käesolevas töös erinevaid fluorestseeruvaid reportervalke ja histokeemilisi meetodeid. Saadud tulemused kinnitasid veelkord, et PF14.-ga ja PF14-PEG-iga on võimalik edukalt transfekteeerida nii kopsu kui ka maksa rakke. Kopsus toimus transfektsioon seejuures kõige paremini bronhide ja veresoonte ümber olevatesse rakkudesse. Tulemused ei viidanud üheselt sellele, kuidas ja kas toimus transfektsioon alveoolidesse. Maksas toimus transfektsioon nii sinusoidides kui veresoontes, mis puhta pDNA puhul piirdus enamasti veresoontega. Siiski jäi RSP vahendatud transfektsioon visuaalselt alla HD manustatud pDNA transfektsioonile.

Kõikide katsete puhul tuleb märkida, et tegemist on kvalitatiivse analüüsiga ja osasi tulemusi on seetõttu võimalik mitmeti mõista. Tulemuste analüüsi tegi keeruliseks ka EGFP ja mCherry detekteerimisel kaasnev autofluoresents, mis hägustab piire tegeliku signaali ja taustamüra vahel. Kokkuvõttes võib öelda, et PF14-ga on võimalik pmCherry ja pEGFP transfekteeerimine maksa ja kopsu ning transfektsiooni lokaliseerimine LSC mikroskoobiga, kuid edasiselt tuleks spetsiifiliste rakkude määramiseks ja selgema signaali saamiseks arendada kudede töötlemise meetodeid.

Evaluation of pDNA transfection with PepFect14 using Laser scanning confocal microscopy.

Hans Vellama

Abstract

Gene delivery is the most straightforward approach to gene therapy. By introducing a healthy gene we can replace the function of a malfunctioning gene or produce therapeutic proteins. On the other hand delivering the gene to the attended cells *in vivo* is a problem that yet remains a difficult task. There are few successful examples of such approach, but more effective delivery systems need to be developed. A promising field of research is CPP-s, which efficiently transfect cells, have very little toxicity and are easily modified for enhancement. A potential candidate for *in vivo* applications is a CPP PepFect14 which has already demonstrated successful gene delivery to the lungs and liver.

To further investigate the specific location of transfection with PF14, we conducted this study, using fluorescent reporter proteins and LSCM. We used PF14 and PF14-PEG to transfect pmCherry and pEGFP to mouse lung and liver tissue through intravenous injection. Tissue sections from the mouse were examined through LSCM to detect gene expression in successfully transfected cells. The results showed successful transfection of pDNA. For the lungs the strongest fluorescent signal came mostly from bronchioles and blood vessels indicating transfection was mostly located to these areas. For the alveoli, transfection wasn't clearly detectable and results remained ambiguous. Liver transfection was successful in all parts of the organ, but showed no predominance over hydrodynamic transfection of pDNA. Overall it is safe to say that the results fulfilled the objectives, but further investigation remains to be done to specify the results.

TÄNUSÕNAD

Täna väga enda juhendajat, Kaido Kurrikoffi, tänu kellele sai see töö valmida ja kes oma teadmisi ja oskusi jagades mind palju õpetas. Samuti täna toetava ja innustava suhtumisega kollektiivi molekulaarse biotehnoloogia laborist.

Kasutatud kirjandus

1. Baird G. S., Zacharias D. A., Tsien R. Y. (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(22): 11984-11989.
2. Choy G., O'Connor S., Diehn F. E., Costouros N., Alexander H. R., Choyke P., and Libutti S. K. (2003). Comparison of noninvasive fluorescent and bioluminescent small animal optical imaging. *BioTechniques* 35: 1022-1030.
3. Clark D. P., Pazdernik N. J. (2009). Gene therapy. *Biotechnology: Applying the genetic revolution*: 477-499. Raamat ei tea kas viidatud õigesti
4. Console S., Marty C., García-Echeverría C., Schwendener R (2003). Ballmer-Hofer K. Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 278(37): 35109-14.
5. Derossi D., Joliot A. H., Chassaing G., and Prochiantz A. (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269(14): 10444-10450.
6. Endoh T., Ohtsuki T. (2009). Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61(9):704-709.
7. Ezzat K., Andaloussi S. E., Zaghloul E. M., Lehto T., Lindberg S., Moreno P. M., Viola J. R., Magdy T., Abdo R., Guterstam P., Sillard R., Hammond S. M., Wood M. J., Arzumanov A. A., Gait M. J., Smith C. I., Hällbrink M., Langel Ü. (2011). PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Res.* 39(12): 5284–5298.
8. Ezzat K., Helmfors H., Tudoran O., Juks C., Lindberg S., Padari K., El-Andaloussi S., Pooga M., Langel U. (2012). Scavenger receptor-mediated uptake of cell-penetrating peptide nanocomplexes with oligonucleotides. *FASEB J.* 26(3): 1172-1180.
9. Farkhani S. M., Valizadeh A., Karami H., Mohammadi S., Sohrabi N., Badrzadeh F. (2014). Cell penetrating peptides: Efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. *Peptides* 57:78-94.
10. Frankel A. D., Pabo C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55(6): 1189-1193.
11. Gary D. J., Puri N., Won Y. Y. (2007). Polymer-based siRNA delivery: Perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *J. Control. Release* 121(1-2): 64-73.

12. Heitz F., Morris M.C., Divita G. (2009). Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* 157(2): 195-206.
13. Inês Rego de Figueiredo, João Miguel Freire, Luís Flores, Ana Salomé Veiga, Miguel A.R.B. Castanho (2014) Cell-penetrating Peptides: A Tool for Effective Delivery in Gene-targeted Therapies. *IUBMB Life* 66(3): 182–194.
14. Ivanova E. A., Maslov M. A., Kabilova T.O., Puchkov P. A., Alekseeva A. S., Boldyrev I. A., Vlassov V. V., Serebrennikova G. A., Morozova N. G., Zenkova M. A. (2013). Structure-transfection activity relationships in a series of novel cationic lipids with heterocyclic head-groups. *Org. Biomol. Chem.* 11(41): 7164-7178. (VB tuleb vahetada kuna ei saa lugeda vist)
15. Juliano R., Alam M. R., Dixit V., Kang H. (2008). Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic. Acids. Res.* 36(12): 4158–4171.
16. Kadi-Liis Veiman (2013). Rakku sisenev peptiid, PepFect14, efektiivseks geeni transpordiks in vitro ja in vivo tingimustes. *Magistritöö*.
17. Kadi-Liis Veiman, Imre Mäger, Kariem Ezzat, Helerin Margus, Tõnis Lehto, Kent Langel, Kaido Kurrikoff, Piret Arukuusk, Julia Suhorutšenko, Kärt Padari, Margus Pooga, Taavi Lehto, Ülo Langel (2013). PepFect14 Peptide Vector for Efficient Gene Delivery in Cell Cultures. *Mol. Pharm.* 10(1): 199-210.
18. Kadi-Liis Veiman, Kadri Künnapuu, Tõnis Lehto, Kristina Kiisholts, Kalle Pärn, Ülo Langel, Kaido Kurrikoff (2015). PEG shielded MMP sensitive CPPs for efficient and tumor specific gene delivery in vivo. *Journal of Controlled Release* 209: 238–247
19. Kangkang An, Peng Zhao, Chao Lin, and Hongwei Liu (2014). A pH and Redox Dual Responsive 4-Arm Poly(ethylene glycol)-block-poly(disulfide histamine) Copolymer for Non-Viral Gene Transfection in Vitro and in Vivo. *Int J Mol Sci.* 15(5): 9067–9081
20. Kaplan I. M., Wadia J. S., Dowdy S. F. (2005). Cationic Tat peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J Control. Release* 102(1): 247–253.
21. Khalil I. A., Futaki S., Niwa M., Baba Y., Kaji N., Kamiya H., Harashima H. (2004). Mechanism of improved gene transfer by the N-terminal stearylation of octaarginine: enhanced cellular association by hydrophobic core formation. *Gene Ther.* 11(7):636-644.
22. Kichler A., Leborgne C., März J., Danos O., Bechinger B. (2003) Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(4):1564-8.

23. Kim H. H., Choi H. S., Yang J. M., Shin S. (2007). Characterization of gene delivery in vitro and in vivo by the arginine peptide system. *Int. J. Pharm.* 335(1-2):70-8.
24. Lehto T., Simonson O. E., Mäger I., Ezzat K., Sork H., Copolovici D. M., Viola J. R., Zaghloul E. M., Lundin P., Moreno P. M., Mäe M., Oskolkov N., Suhorutšenko J., Smith C. I., Andaloussi S. E. (2011). Apeptide-based vector for efficient gene transfer in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* 19(8):1457-1467.
25. Li S., Huang L. (2000). Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther.* 7(1): 31-34.
26. Maniti O., Blanchard E., Trugnan G., Lamazière A., Ayala-Sanmartin J. (2012). Metabolic energy-independent mechanism of internalization for the cell penetrating peptide penetratin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44(6) :869-75.
27. Margus H., Padari K., Pooga M.. (2012). Cell-penetrating Peptides as Versatile Vehicles for Oligonucleotide Delivery. *Mol. Ther.* 20(3): 525-33.
28. Marika Ruponen, Paavo Honkakoski, Seppo Rönkkö, Jukka Pelkonen, Markku Tammi, Arto Urtti (2003). Extracellular and intracellular barriers in non-viral gene delivery. *J. Control. Release.* 93(2): 213-217.
29. Mark A. Kay, Dexi Liu, and Peter M. Hoogerbrugge (1997). Gene therapy. *Sama lugu nagu alumisel*
30. Martin M. E., Rice K. G. (2007). Peptide-guided Gene Delivery. *AAPS J.* 9(1):E18-29.
31. Mary-Louise Rogers and Robert Archer Rush (2012). Non-viral gene therapy for neurological diseases, with an emphasis on targeted gene delivery. *Journal of Controlled Release* 157(2): 183–189.
32. Mary-Louise Rogers, Kevin S. Smith, Dusan Matusica, Matthew Fenech, Lee Hoffman, Robert A. Rush, Nicolas H. Voelcker (2014). Non-viral gene therapy that targets motor neurons in vivo. *Front. Mol. Neurosci.* 14(7):80.
33. McLean J. W., Fox E. A., Baluk P., Bolton P. B., Haskell A., Pearlman R., Thurston G., Umemoto E. Y., McDonald D. M. (1997). Organ-specific endothelial cell uptake of cationic liposome-DNA complexes in mice. *Am. J. Physiol.* 273: H387-404.
34. Mehier-Humbert S. and Guy R. H. (2005). Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 57(5): 733-753.
35. Michael Neua, Oliver Germershaus, Shirui Mao, Karl-Heinz Voigt, Martin Behec, Thomas Kissela (2007). Crosslinked nanocarriers based upon poly(ethylene imine) for

- systemic plasmid delivery: In vitro characterization and in vivo studies in mice. *Journal of Controlled Release* 118(3): 370–380.
36. Min S. H., Kim D. M., Kim M. N., Ge J., Lee D. C., Park I. Y., Park K. C., Hwang J. S., Cho C. W., Yeom Y. I. (2010). Gene delivery using a derivative of the protein transduction domain peptide, K-Antp. *Biomaterials* 31(7): 1858-64.
 37. Morris M. C., Depollier J., Mery J., Heitz F., Divita G. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 19(12): 1173-1176.
 38. Morris M. C., Deshayes S., Heitz F., Divita G. (2008). Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol. Cell.* 100(4):201-17.
 39. Morris M. C., Gros E., Aldrian-Herrada G., Choob M., Archdeacon J., Heitz F., Divita G. (2007). A non-covalent peptide-based carrier for in vivo delivery of DNA mimics. *Nucleic Acids Res.* 35(7):e49.
 40. Morris M. C., Vidal P., Chaloin L., Heitz F., Divita G. (1997). A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 25(14): 2730-2736.
 41. Muratovska A., Eccles M. R. (2004). Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian. *FEBS Lett.* 558(1-3):63-8.
 42. Mäe M., Andaloussi S. E., Lehto T., Langel Ü. (2009). Chemically modified cell-penetrating peptides for the delivery of nucleic acids. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6(11): 1195-1205.
 43. Mäe M., El Andaloussi S., Lundin P., Oskolkov N., Johansson H. J., Guterstam P., Langel U. (2009). A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J. Control. Release.* 134(3):221-7.
 44. Nakase I., Tadokoro A., Kawabata N., Takeuchi T., Katoh H., Hiramoto K., Negishi M., Nomizu M., Sugiura Y., Futaki S. (2007). Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry.* 46(2):492-501.
 45. Nathan C. Shaner, Robert E. Campbell Paul A. Steinbach, Ben N. G. Giepmans, Amy E. Palmer ja Roger Y. Tsien (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* (22): 1567 – 1572
 46. O'Brien J. A., Lummis S. C. (2006). Biolistic transfection of neuronal cultures using a hand-held gene gun. *Nat. Protoc.* 1(2): 977-981.

47. Pang H. B., Braun G. B., Friman T., Aza-Blanc P., Ruidiaz M. E., Sugahara K. N., Teesalu T., Ruoslahti E. (2014). An endocytosis pathway initiated through neuropilin-1 and regulated by nutrient availability. *Nat. Commun.* 5:4904.
48. Perche F., Torchilin V. P. (2013). Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting. *J. Drug. Deliv.*
49. Pham P. L., Kamen A., Durocher Y. (2006). Large-Scale Transfection of Mammalian Cells for the Fast Production of Recombinant Protein. *Mol. Biotechnol.* 34(2):225-37.
50. Pooga M., Hällbrink M., Zorko M., Langel U. (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB J.* 12(1):67-77.
51. Pooga M., Soomets U., Hällbrink M., Valkna A., Saar K., Rezaei K., Kahl U., Hao J. X., Xu X. J., Wiesenfeld-Hallin Z., Hökfelt T., Bartfai T., Langel U. (1998). Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat Biotechnol.* 16(9): 857-61.
52. Rajpal, Mann A., Khanduri R., Naik R. J., Ganguli M. (2012). Structural rearrangements and chemical modifications in known cell penetrating peptide strongly enhance DNA delivery efficiency. *J. Control. Release.* 157(2): 260-271.
53. Recillas-Targa F. (2006). Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Molecular Biotechnology*, 34(3): 337-354.
54. Richard J. P., Melikov K., Brooks H., Prevot P., Lebleu B., Chernomordik V. (2005). Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J. Biol. Chem.* 280(15): 15300-6.
55. Rittner K., Benavente A., Bompard-Sorlet A., Heitz F., Divita G., Brasseur R., Jacobs E. (2002). New Basic Membrane-Destabilizing Peptides for Plasmid- Based Gene Delivery in Vitro and in Vivo. *Mol. Ther.* 5(2): 104-14.
56. Rukkumani Rajagopalan, Jennifer Xavier, Nandini Rangaraj, Nalam Madhusudhana Rao, Vijaya Gopal, (2007). Recombinant fusion proteins TAT-Mu, Mu and Mu-Mu mediate efficient non-viral gene delivery. *J. Gene Med.* 9: 275–286.
57. Saunders A, Johnson C. A., and Sabatini B. S. (2012). Novel recombinant adeno-associated viruses for Cre activated and inactivated transgene expression in neurons. *Front. Neural. Circuits.* 6: 47.
58. Schwarze S. R., Ho A., Vocero-Akbani A., Dowdy S. F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science.* 285(5433): 1569-72.

59. Shigekawa K., Dower W. J., (1988). Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques*. 6(8): 742-751.
60. Soomets U., Lindgren M., Gallet X., Hällbrink M., Elmquist A., Balaspiri L., Zorko M., Pooga M., Brasseur R., Langel U. (2000). Deletion analogues of transportan. *Biochim. Biophys. Acta*. 1467(1):165-76.
61. Svensen N., Walton J. G. A., Bradley M. (2012) Peptides for cell selective drug delivery. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 186–192.
62. Tae Kyung Kim and James H. Eberwine (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8): 3173-3178.
63. Thomas C. E., Ehrhardt A., Kay M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 4: 346-358.
64. Thomas Wirtha, Nigel Parkerb, Seppo Ylä-Herttuala (2013). History of gene therapy. *Gene* 525(2): 162-169.
65. Wender P. A., Mitchell D. J., Pattabiraman K., Pelkey E. T., Steinman L., Rothbard J. B. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(24): 13003-8.
66. Verma I. M., Somia N. (1997). Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature* 389: 239-242
67. Won Y. W., Kim H. A., Lee M., Kim Y. H. (2010). Reducible Poly(oligo-d-arginine) for Enhanced Gene Expression in Mouse Lung by Intratracheal Injection. *Mol. Ther.* 18(4): 734-742.
68. Woods N. B., Muessig A., Schmidt M., Flygare J., Olsson K., Salmon P., Trono D., von Kalle C., Karlsson S. (2003) Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood*. 101(4): 1284-1289.
69. Ülo Langel 2010. Cell-penetrating peptides, p. 373-375. In Ülo Langel, Benjamin F. Cravatt, Astrid Gräslund, Gunnar von Heijne, Tiit Land, Sherry Niessen, Matjaž Zorko, Introduction to peptides and proteins, CRC Press.
70. Yao C. P., Zhang Z. X., Rahmanzadeh R., Huettmann G. (2008) Laser-based gene transfection and gene therapy. *IEEE Trans Nanobioscience* 7(2): 111-119.
71. Young-Wook Won, Kwang Suk Lim, Yong-Hee Kim (2011). Intracellular organelle-targeted non-viral gene delivery systems. *J. Control. Release*. 152(1): 99-109.

Kasutatud internetileheküljed

Link 1: <http://www.lifetechnologies.com/ee/en/home/brands/product-brand/lipofectamine/lipofectamine-2000.html> Külastatud 13.04. 2015

Link 2: <https://www.lifetechnologies.com/ee/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/electroporation.html> Külastatud 14.04. 2015

Link 3: <http://www.asgct.org/general-public/educational-resources/gene-therapy--and-cell-therapy-defined> Külastatud 13.05. 2015

Link 4: <http://ctrngenpath.net/static/atlas/mousehistology/Windows/respiratory/lungs.html> Külastatud 13.05. 2015

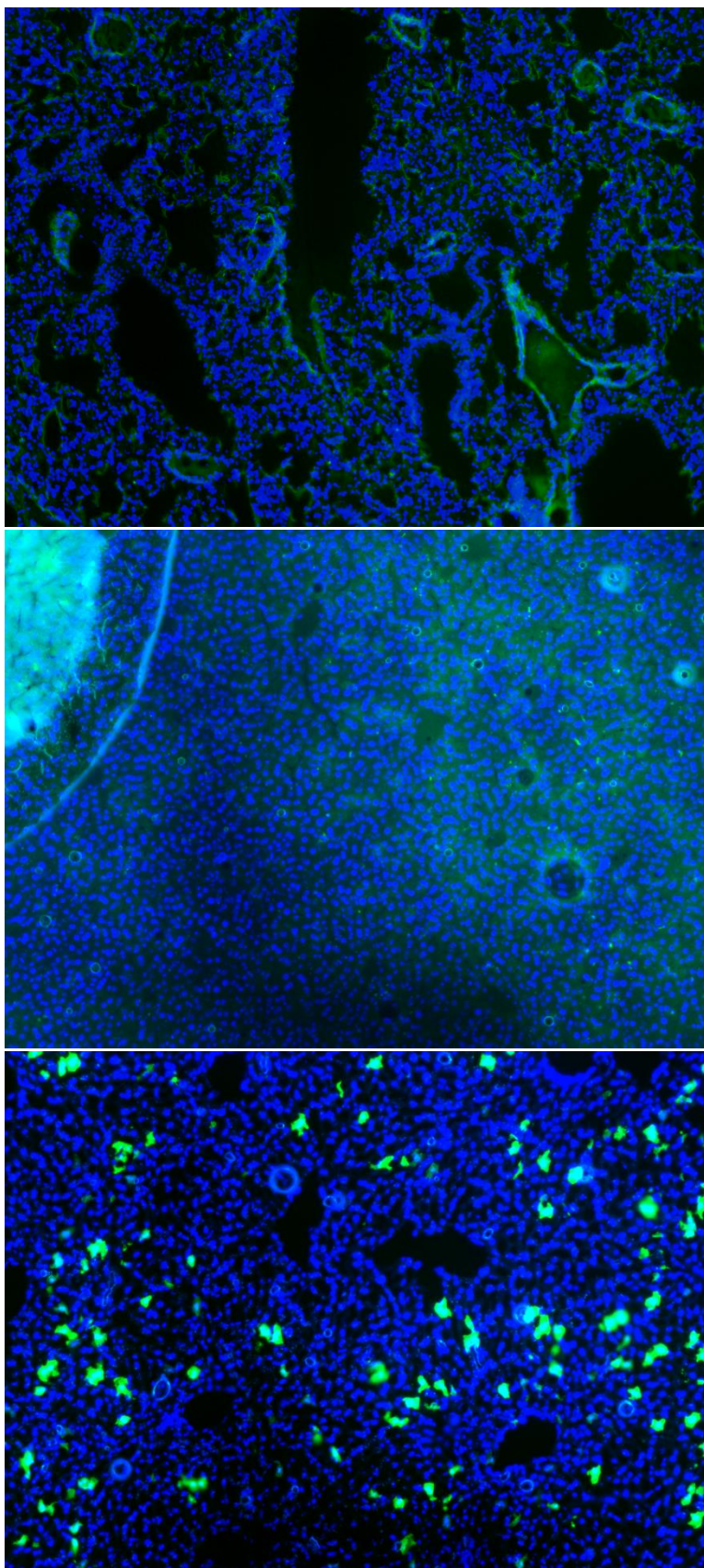
Link 5: <http://mousepheno.ucsd.edu/overview.shtml> Külastatud 13.05. 2015

Link 6: <http://www.deltagen.com/target/histologyatlas/HistologyAtlas.html> Külastatud 13.05. 2015

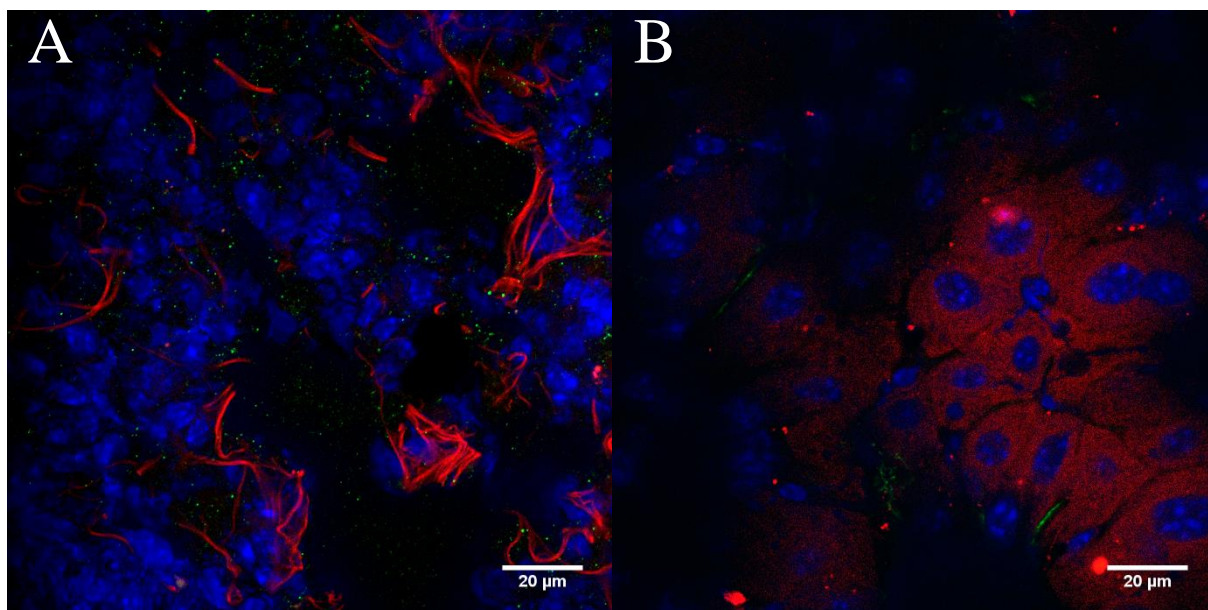
Link 7:

[http://www.clontech.com/US/Products/Fluorescent Proteins and Reporters/Fluorescent Proteins by Name/mCherry Fluorescent Protein](http://www.clontech.com/US/Products/Fluorescent_Proteins_and_Reporters/Fluorescent_Proteins_by_Name/mCherry_Fluorescent_Protein) Külastatud 25.05.2015

Lisa 1



Joonis 6: pEGFP-ga transfecteeritud hiir. Ülevalt alla: PF14-pEGFP transfecteeritud kops; PF14-pEGFP transfecteeritud maks; HD transfecteeritud pEGFP maks. Sinine signaal on DAPI-ga värvunud tuumad. Roheline signaal on fluorestseeruv EGFP valg.



Joonis 7. IHC protokoll järgi töödeldud kops (A) ja maks (B). Sinine signaal on DAPI-ga värvunud tuumad. Punane signaal on fluorestseeruv mCherry valk. Roheline signaal märgib antiCD31 antikehaga märgistatud epiteelkudet.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Hans Vellama

(autori nimi)

(sünnikuupäev: 05.10.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
**PepFect14 *in vivo* transfektsiooniefektiivsuse hindamine hiire kopsus ja maksas
laserkonfokaalmikroskoobiga.**

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on PhD Kaido Kurrikoff,

(juhendaja nimi)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2017** (pp.kk.aaaa) kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2015 (*kuupäev*)